

氏 名	荒木 俊雄
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第5142号
学位授与の日付	平成27年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	糖尿病診断用マーカー1,5-アンヒドロ-D-グルシトールを基質とするソルボース 脱水素酵素とピラノース酸化酵素の機能解析と応用
論文審査委員	教授 稲垣 賢二                      教授 田村 隆                      教授 木村 吉伸

### 学位論文内容の要旨

糖尿病は、血液中の血糖値をコントロールできなくなり、高血糖状態となる疾患である。糖尿病は自覚症状に乏しく、その発見が遅れる場合がある。また、一旦糖尿病と診断された場合、その完治は難しいとされ、その病態が進行すると重篤な合併症を発症する疾患である。糖尿病の診断や糖尿病患者の治療においては、一般的には測定時から過去一定期間の平均血糖を反映するマーカーが管理指標として用いられる。幾つかのマーカーが知られているが、その中の一つである1,5-アンヒドロ-D-グルシトール(1,5-AG)は、過去数日間の平均血糖を反映する指標として知られ、その他のマーカーでは捉えることが困難な食後高血糖を捉えるマーカーとして注目されている。1,5-AGは、1,5-AGに作用する酵素を用いた酵素法により臨床で測定されている。2種類の体外診断薬が販売されているが、これらの測定方法は、1,5-AGに反応する酵素の基質特異性に課題があり、測定に複数のステップを必要とする。仮に1,5-AGのみに特異的に反応する酵素を見いだせば、測定系を簡略化できると考えられる。また一方で、近年では糖尿病患者が自身で自らの血糖を簡便に測定できる、小型の酵素センサが広く普及している。本センサにはD-グルコースに反応する酵素が搭載されているが、酸化酵素では酵素反応が血中の溶存酸素の影響を受けるとされ、現在は酸素の影響を受けない脱水素酵素が主流となっている。このような小型酵素センサに1,5-AG測定用酵素を搭載できれば、1,5-AGの測定は更に簡便となると考えられる。本研究では、臨床への応用を目的として、1,5-AGを基質とするソルボース脱水素酵素とピラノース酸化酵素の機能解析とその応用について報告する。

#### 第1章 *Sinorhizobium* sp. 97507 由来ソルボース脱水素酵素の性質検討及び1,5-AG測定への応用

本章では、根粒菌 *Sinorhizobium* sp. 97507 からソルボース脱水素酵素と推測される遺伝子を取得し、組換え大腸菌を構築した。組換え発現させた酵素を精製し、酵素諸性質の評価を行った。精製された本酵素はL-ソルボースと1,5-AGに高い基質特異性を有しており、それらの基質に対する  $K_m$  値はそれぞれ62.4 mM, 97.5 mMであった。その触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) はL-ソルボースと1,5-AGにおいてそれぞれ  $179.0 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $145.0 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  と同程度であった。1,5-AG濃度の定量では、0.5 mMから5 mMまでの濃度で検量線に直線性が認められた。

#### 第2章 部位特異的変異導入によるピラノース酸化酵素の色素依存性脱水素酵素活性の向上

本章では、電気化学的な検出が可能な脱水素酵素の開発を目的として、公知文献の手法を参考に1,5-AGへの作用性を示す basidiomycetous fungus No. 52 由来ピラノース酸化酵素 (PROD) へ部位特異的変異を導入した。その結果、野生型が酸化酵素活性と同程度の脱水素酵素活性を有していることが明らかとなった。また作製した11種類の改変体中、4種類において酸化酵素活性と比べて脱水素酵素活性が高い改変体を取得した。その中で、改変体 Q421A は酸化酵素活性が野生型の8.8%まで低下し、改変体 L216A は脱水素酵素活性が野生型の約2.8倍向上した。以上の結果から、basidiomycetous fungus No. 52 由来ピラノース酸化酵素 (PROD) へ部位特異的変異を導入することにより、酸化酵素活性よりも色素依存性脱水素酵素活性が高い改変体を複数取得することができた。

本研究では、*Sinorhizobium* sp. 97507 から1,5-AGを基質とするソルボース脱水素酵素を見出し、その諸性質を明らかにした。一方で、部位特異的変異導入により basidiomycetous fungus No. 52 由来ピラノース酸化酵素の機能改変を行い、酸化酵素活性と比べて色素依存性脱水素酵素活性が向上した改変体を取得した。これら2種の酵素は、今後実用的な酵素を開発する際の基盤となるものである。

## 論文審査結果の要旨

1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (1,5-AG) は、糖尿病の診断マーカーの 1 つであり、測定時から過去数日間の平均的な血糖状態を反映する。またこの 1,5-AG は、隠れ糖尿病とも言われる食後高血糖などを捉えるマーカーとして近年注目されている。本マーカーは臨床検査において酵素法によりすでに測定されているが、測定用酵素には 1,5-AG に対する基質特異性の優れた酵素が望まれていた。また近年では糖尿病患者が自己の血糖値を測定する酵素センサーが普及し、その装置に搭載される酵素は脱水素酵素が主に搭載されている。本論文は上記を鑑み、1,5-AG 測定の更なる普及を見据え、1,5-AG に特異的に作用する基質特異性の優れた脱水素酵素の開発を目的とし、行われたものである。本論文では、これまでに報告がなされていない *Sinorhizobium* sp. 97507 由来のソルボース脱水素酵素が、1,5-AG に反応性を示す脱水素酵素であることを初めて見出し、その酵素の諸性質を明らかにした。精製酵素の評価により、本酵素が天然状態では二量体を形成している可能性を示唆し、また本酵素が L-sorbose と 1,5-AG に特異的に作用し、その他の糖類には、作用しないことを明らかとした。更に速度論的な解析により、L-sorbose と 1,5-AG の触媒効率は同程度であることを明らかとした。また *Sinorhizobium* sp. 97507 由来のソルボース脱水素酵素の熱安定性が低いことを鑑み、基質特異性に課題があるものの熱安定性の優れた、1,5-AG に反応する basidiomycetous fungus No. 52 由来ピラノース酸化酵素に変異を導入し、野生型酵素と比べて脱水素酵素活性が向上した改変を開発した。主に酸化酵素活性のみを有する酵素を脱水素酵素活性を触媒する酵素に改変した報告例を参考として変異導入し、野生型酵素に対する脱水素酵素活性が 2.8 倍向上した改変体を取得した。1,5-AG を基質とする *Sinorhizobium* sp. 97507 由来のソルボース脱水素酵素、及び脱水素酵素活性が向上した basidiomycetous fungus No. 52 由来ピラノース酸化酵素の改変体は、今後の 1,5-AG 測定用酵素開発の基盤となるものである。上記の論文内容、発表会における応答を総合的に審査した結果、博士の学位に値するものと判断した。